

TÍTULO**CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE CARTÍLAGO Y SUS APLICACIONES**

La presente invención se refiere a métodos para el aislamiento de células madre adultas, células aisladas por éstos métodos y aplicaciones de éstas. En concreto, la invención se refiere a células madre adultas aisladas, derivadas de condrocitos desdiferenciados, con capacidad para diferenciarse y dar lugar a una serie de linajes celulares, así como a los marcadores específicos presentes en estas células, como pueden ser los antígenos de superficie celular. Los usos para dichas células incluyen su utilización en terapia celular así como en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El trasplante de órganos y tejidos proporciona una serie de tratamientos prometedores para diversas patologías, convirtiendo a las terapias regenerativas en el objetivo central de investigación de muchos campos de la biomedicina. No obstante, existen dos problemas importantes asociados al trasplante de órganos y tejidos. El primero y mayor de ellos es la escasez de donantes. Así, por ejemplo, en EE.UU, únicamente se dispone de un 5% de los órganos que se requieren para trasplantes (Evans *et al.*, 1992).

20

En segundo lugar, existe el problema de la incompatibilidad potencial del tejido transplantado con el sistema inmune del receptor. Dicha incompatibilidad hace que el órgano o tejido transplantado sea reconocido como un elemento extraño por el sistema inmune del receptor lo que obliga a administrar al paciente transplantado fármacos inmunosupresores durante el resto de su vida, implicando un coste elevado tanto físico como económico. Una posible solución a la escasez de donantes de órganos y tejidos podría ser el uso de órganos o tejidos animales, proceso denominado xenotrasplante. Sin embargo, este enfoque empeora el problema del rechazo y contribuye a que haya riesgos serios de transmisión de patógenos animales a humanos (Patience *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998).

Actualmente, el desarrollo de la tecnología en el campo de las células madre ha hecho que éstas sean consideradas como una prometedora fuente de órganos y tejidos para aquellos tipos de patologías en las que sea necesario el trasplante de órganos o

tejidos. Teóricamente, las células madre pueden sufrir divisiones celulares destinadas a su auto-mantenimiento durante un tiempo ilimitado para originar células fenotípica y genotípicamente idénticas. Además, tienen la capacidad de diferenciar a uno o varios tipos celulares concretos ante ciertas señales o estímulos.

5

La generación de órganos y tejidos a partir de las propias células madre de un paciente o a partir de células heterólogas inmunocompatibles de tal forma que el sistema inmune del receptor no las reconozca como extrañas, permite una serie de ventajas asociadas que solventan el problema que acarrean la escasez de donantes y el riesgo de rechazo. El uso de células madre para la regeneración de órganos y tejidos constituye una terapia alternativa prometedora para diversas patologías humanas, incluyendo: lesiones condrales, óseas y musculares, enfermedades neurodegenerativas, rechazo inmunológico, enfermedades cardíacas y desórdenes de la piel (ver patentes US 5.811.094, 5.958.767, 6.328.960, 6.379.953, 6.497.875).

15

Aparte de las aplicaciones en terapia celular, las células madre presentan muchas otras potenciales aplicaciones relacionadas con las tecnologías biomédicas que pueden ayudar a facilitar actividades de investigación y desarrollo biofarmacéuticos. Una de estas aplicaciones radica en el desarrollo de modelos celulares de enfermedades humanas y animales, que pueden ayudar a mejorar sustancialmente la rapidez y eficacia de los procesos de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Actualmente, la forma comúnmente usada de medir la actividad biológica de un nuevo compuesto antes de entrar en ensayos clínicos es mediante incompletas técnicas bioquímicas o modelos animales costosos e inadecuados. Las células madre pueden ser una fuente potencial de cantidades virtualmente ilimitadas de células, tanto indiferenciadas como diferenciadas, para la realización de ensayos *in vitro* dirigidos a la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos (Patente US 6.294.346), así como a determinar su actividad, metabolismo y toxicidad. El desarrollo de tales ensayos, en especial de sistemas de escrutinio de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS), ayudará a reducir tiempo y dinero a la hora de desarrollar compuestos con actividad terapéutica, permitirá prescindir en gran medida del uso de animales de experimentación y también contribuirá a que haya una menor exposición por parte de los pacientes a los efectos adversos de los compuestos durante los ensayos clínicos. Además, la disponibilidad de

un surtido de diversos tipos celulares de varios individuos permitiría un mayor entendimiento de los efectos de un compuesto potencialmente terapéutico sobre un individuo concreto, llegando a un desarrollo completo del campo de la farmacogenómica, donde la actividad de un compuesto se correlacionaría con la estructura genética de un individuo. Las células madre y su progenie diferenciada tienen también un gran valor en el proceso de búsqueda y caracterización de nuevos genes involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación celular y los procesos neoplásicos (Phillips *et al.*, 2000; Ramalho-Santos *et al.*, 2002; Ivanova *et al.*, 2002). Ya han sido descritos sistemas de expresión de genes para su utilización en combinación con sistemas HTS basadas en células (Jayawickreme y Kost, 1997).

Según el origen de las células madre podemos diferenciar entre células madre embrionarias (células ES) y células madre adultas. Las células ES proceden de la masa celular interna de los blastocistos y tienen como característica principal el hecho de ser pluripotenciales, lo que significa que pueden dar lugar a cualquier tejido adulto derivado de las tres capas embrionarias (Evans y Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Patente US 6.200.806). Las células madre adultas son células parcialmente comprometidas presentes en tejidos adultos, las cuales pueden permanecer décadas en el cuerpo humano, aunque con el paso del tiempo comienzan a escasear (Fuchs y Segre, 2002).

A pesar de la alta pluripotencialidad de las células ES, las terapias basadas en el uso de células madre adultas presentan una serie de ventajas sobre aquellas basadas en células ES. En primer lugar, resulta complicado controlar las condiciones de cultivo de las células ES sin inducir su diferenciación (Thomson *et al.* 1998), lo que eleva el coste económico y el trabajo necesarios para el uso de este tipo de células. Es más, las células ES deben pasar a través de varios estadios intermedios antes de convertirse en el tipo celular concreto necesario para tratar una patología en particular, proceso controlado por compuestos químicamente complejos. Además, existe una fuerte controversia con relación a las células ES debido a la extendida creencia que la vida humana comienza con la fertilización, de tal forma que el consentimiento informado firmado por los donantes no elimina el estigma ético que implica la utilización de embriones en investigación. Aparte, hay que considerar una serie de problemas relacionados con la

seguridad del uso terapéutico de las células ES, debido a que células madre indiferenciadas procedentes de tejido embrionario presentan altas probabilidades de producir un tipo de tumores denominados teratocarcinomas (Evans y Kaufman, 1981).

5 Por último, las células derivadas de células ES son normalmente objeto de rechazo por parte del sistema inmunológico debido a que el perfil inmunológico de tales células difiere del correspondiente al receptor. Aunque este problema podría ser abordado mediante la utilización de un proceso denominado "clonación terapéutica", en el cual se pueden obtener células ES autólogas transfiriendo el núcleo de una célula somática de un paciente al ovocito de una mujer donante, esta técnica no ha sido desarrollada todavía en humanos y presenta serios problemas éticos y legales (la clonación humana es ilegal en muchos países). Otra solución podría ser la generación de líneas celulares "universales" que posean una compatibilidad inmune generalizada, pero a día de hoy no existe ninguna tecnología que permita obtener dichas células.

10

15 Por el contrario, las células madre adultas no son rechazadas por el sistema inmune si han sido obtenidas por trasplante autólogo. Además el hecho de que estén parcialmente comprometidas reduce el número de etapas de diferenciación necesarias para generar células especializadas. Aparte, el uso de este tipo de células no está asociado a ningún tipo de controversia ética o legal. Además, aunque este tipo de células presente una menor potencialidad de diferenciación que las células ES, la mayoría de ellas son realmente multipotentes (Joshi y Enver, 2002) lo que significa que pueden diferenciarse a más de un tipo de tejido. Lo que esto sugiere es que, en caso de obtener una fuente conveniente de células madre adultas, podríamos llegar a proporcionar diferentes tipos celulares capaces de cubrir múltiples aplicaciones terapéuticas distintas.

20

25

30 Sin embargo, una desventaja importante del uso de las células madre adultas radica en su escasez, lo que hace que cualquier proceso para la obtención y aislamiento de este tipo de células sea difícil y costoso. Un problema añadido radica en que la mayoría de las actuales fuentes de obtención de células madre están contaminadas con otros tipos celulares, complicando esto el proceso de identificación, aislamiento y

caracterización de las poblaciones de células madre pensadas para ser utilizadas con fines terapéuticos u otros usos.

Actualmente, las mejores fuentes de células madre adultas son: medula ósea (Spangrude *et al.*, 1988; Osawa *et al.*, 1996; Bhatia *et al.*, 1997; Fridenshtein, 1982; Prockop, 1997; Pittenger *et al.*, 1999; Patente US 5.486.359), sangre periférica (Barr y McBride, 1982; Russell y Hunter, 1994), cordón umbilical (Broxmeyer *et al.*, 1989), tejido neural (McKay, 1997; Johansson *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 1999; Gage, 2000), tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; solicitud de patente WO 03/022988), 10 córnea (Daniels, *et al.*, 2001), piel (Watt, 2001; Toma *et al.*, 2001), epitelio gastrointestinal (Marshman *et al.*, 2002), músculo (Grounds *et al.*, 1992), hígado (Forbes *et al.*, 2003) y pulpa dental (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta la fecha de hoy ninguna de estas fuentes ha sido capaz de proporcionar células madre adultas que cumplan todos y cada uno de los siguientes requisitos: 15 multipotencialidad, ensayos reproducibles, ausencia de contaminación y perfecta caracterización.

Recientemente, se ha aislado un nuevo tipo de célula madre de mamífero denominado "Multipotent Adult Progenitor Cell" (MAPC) a partir de medula ósea y otros tejidos (Reyes *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2002b; solicitud de patente WO 01/11011). Este tipo de célula madre parece ser la progenitora de las llamadas células madre mesenquimales, y muestra una gran multipotencialidad. Sin embargo su aislamiento y cultivo conlleva un proceso largo y costoso en el que se han de incluir grandes cantidades de diversos factores de crecimiento.

25

Por lo tanto, existe la necesidad de conseguir una fuente fácilmente disponible de células madre adultas multipotentes. En particular, células que puedan ser fácilmente aisladas de un sujeto vivo sin que esto implique riesgos o molestias significativas, sin que el coste del aislamiento y cultivo sea elevado, y con una contaminación mínima por otros tipos celulares.

El cartílago es un tejido compuesto de un único elemento celular, condrocitos, y de una matriz extracelular (ECM) que rodea a los condrocitos. Gracias a esta simple

estructura y composición celular, el cartílago podría ser una prometedora fuente potencial de células madre, en caso de que estas células pudiesen ser identificadas y caracterizadas. Además, la extracción de tejido cartilaginoso se realiza usando un procedimiento poco invasivo en comparación con otros procedimientos (p.ej. extracción de medula ósea) y poco contaminado en comparación con otros procedimientos (p.ej. extracción de tejido adiposo) y sin repercusiones serias para el paciente.

El cartílago articular adulto es avascular, alinfático, aneural y se nutre a partir del líquido sinovial (Mankin y Brandt, 1984). Las únicas células presentes en el cartílago articular son los condrocitos, responsables de su síntesis, mantenimiento y renovación de la ECM, que a su vez está fundamentalmente compuesta por una red de fibras de colágeno altamente hidratadas insertadas en un gel de proteoglicanos cargados (Maroudas, 1979). La digestión de la ECM usando colagenasa permite el aislamiento de los condrocitos que subsiguientemente pueden ser crecidos y expandidos *in vitro* (Mitrovic *et al.*, 1979).

Es conocido que el cultivo en monocapa de cartílago articular conduce de forma invariable a su desdiferenciación, proceso durante el cual las células recuperan su habilidad para dividirse, pierden su fenotipo redondeado y dejan de producir colágeno de los tipos II, IX y XI para producir los tipos I, III y V (Mayne *et al.*, 1976; von der Mark *et al.*, 1977; Benya *et al.*, 1977; Benya *et al.*, 1978; Benya y Minni, 1979; Benya y Shafter, 1982; Finer *et al.*, 1985; Elima *et al.*, 1989). Algunos autores han demostrado que condrocitos desdiferenciados de origen embrionario (Hegert *et al.*, 2002) o adulto (Tallheden *et al.*, 2003) podrían diferenciarse *in vitro* a varios tipos celulares mesenquimales, pero todavía nadie ha aislado y caracterizado en detalle una población definida de células madre aisladas de cartílago articular ni demostrado su multipotencialidad.

La presente invención proporciona una población de células madre multipotentes adultas procedentes de cartílago de mamífero, preferiblemente de cartílago articular humano, aisladas y caracterizadas en detalle demostrando además su multipotencialidad. Esta y otras realizaciones de la invención se harán aparentes a través de la descripción, Figuras y Ejemplos que siguen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- Un primer aspecto de la invención consiste en proporcionar una población aislada de células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados, 5 perfectamente caracterizada y libre de otros tipos celulares. Preferiblemente, dichos condrocitos se obtienen de cartílago articular humano mediante artroscopia, la cual es un procedimiento médico rutinario que conlleva un riesgo y grado de incomodidad mínimos para el paciente.
- 10 Un segundo aspecto de la presente invención consiste en la obtención *in vitro*, a partir de dichas células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados, de poblaciones celulares diferenciadas a diversos linajes, incluyendo pero sin limitarse a los linajes mesenquimales y neurales.
- 15 Un tercer aspecto de la invención consiste en proporcionar una población celular transgénica, derivada de dichas células aisladas previamente mencionadas, por modificación de su genoma.
- 20 Un cuarto aspecto de la invención consiste en utilizar las células aisladas anteriormente mencionadas para la preparación de composiciones farmacéuticas que pueden emplearse en la reparación de tejidos y órganos. Dichas composiciones farmacéuticas constituyen un aspecto adicional de la presente invención.
- 25 Un quinto aspecto de la invención consiste en utilizar las células aisladas anteriormente mencionadas para la evaluación de la actividad biológica de distintos agentes *in vitro* e *in vivo*.
- Otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una fotomicrografía de contraste de fases de las células madre de la presente invención.

5 La Figura 2A muestra histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes a marcadores de superficie positivos en las células madre de la presente invención. Los histogramas llenos en negro corresponden al marcaje con el anticuerpo específico, mientras que los vacíos corresponden a la tinción con el control de isotipo.

10

La Figura 2B muestra histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes a marcadores de superficie negativos en las células madre de la presente invención. Los histogramas llenos en negro corresponden al marcaje con el anticuerpo específico, mientras que los vacíos corresponden a la tinción con el control de isotipo.

15 La Figura 3A es una fotomicrografía de contraste de fases de las células madre de la presente invención diferenciadas *in vitro* hacia fenotipo óseo. Las células diferenciadas se han teñido con Alizarin Red para detectar la matriz de fosfato cálcico secretada por las células diferenciadas.

20 La Figura 3B es una fotomicrografía de contraste de fases claro de las células madre de la presente invención sin diferenciar, teñidas de la misma forma que las células diferenciadas de la Figura 3A.

25

La Figura 4A es una fotomicrografía de contraste de fases de las células madre de la presente invención diferenciadas *in vitro* hacia fenotipo muscular. Las células diferenciadas se han teñido con un anticuerpo específico para la cadena pesada de la miosina, un antígeno específico de músculo.

30

La Figura 4B es una fotomicrografía de campo claro de las células madre de la presente invención sin diferenciar, teñidas de la misma forma que las células diferenciadas de la Figura 4A.

La Figura 5A muestra dos fotomicrografías de inmunofluorescencia de las células madre de la presente invención diferenciadas *in vitro* hacia fenotipo neuronal. Las células diferenciadas se han teñido con un anticuerpo específico para NF200, un antígeno específico de neuronas.

5

La Figura 5B muestra dos fotomicrografías de inmunofluorescencia de las células madre de la presente invención diferenciadas *in vitro* hacia fenotipo neuronal. Las células diferenciadas se han teñido con un anticuerpo específico para TuJ1, un antígeno específico de neuronas.

10

La Figura 6 es una representación gráfica del número de clones aislados de las células madre de la presente invención capaces de diferenciarse a tres tejidos mesodérmicos distintos (AOC; adiposo=A; óseo=O; cartílago=C), a dos de ellos (AO, AC, OC), sólo a uno (A, O, C), o a ninguno (-).

15

La Figura 7A es una fotomicrografía de fluorescencia de las células madre de la presente invención transducidas con un vector retroviral que codifica la proteína verde fluorescente (GFP).

20

La Figura 7B muestra un histograma de citometría de fluorescencia que cuantifica la fluorescencia de las células transducidas retroviramente de la Figura 7A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una población aislada de células madre multipotentes, derivada de condrocitos desdiferenciados de mamífero, caracterizada en detalle y libre de otros tipos celulares. Preferentemente, la población celular aislada objeto de la invención procede del tejido cartilaginoso de un primate, preferiblemente de un humano. Normalmente, la célula objeto de la invención procederá de cartílago articular humano y, en particular, de tejido cartilaginoso procedente de la articulación de la rodilla. Las células madre y derivados de éstas en la presente invención podrán ser usadas para diversas aplicaciones, entre las que se incluyen: terapias basadas en el trasplante autólogo y alogénico, desarrollo de modelos de

enfermedad, desarrollo de ensayos de búsqueda de genes y en la búsqueda y desarrollo de fármacos.

En una realización particular, la invención proporciona una célula madre adulta multipotente, procedente de condrocitos desdiferenciados de mamífero, caracterizada por ser positiva para los siguientes antígenos de superficie: CD9, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90, CD95, CD105, CD106, CD166, HLA-I y beta2-microglobulina.

En una realización preferida de la invención, se proporciona una célula madre adulta multipotente aislada derivada de condrocitos desdiferenciados de mamífero, caracterizada por el siguiente fenotipo: positiva para los marcadores CD9, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90, CD95, CD105, CD106, CD166, HLA-I y beta2-microglobulina; negativa para los marcadores CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD51, CD56, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD71, CD102, CD104, CD117, CD133, HLA-II.

Poblaciones celulares aisladas constituidas por, o que comprenden, dichas células madre adultas multipotentes aisladas procedentes de condrocitos desdiferenciados de mamífero, constituyen realizaciones particulares de la presente invención.

La célula madre multipotente aislada objeto de la presente invención se obtiene a partir de condrocitos adultos desdiferenciados aislados de biopsias de cartílago procedentes de sujetos vivos. En una realización preferida de la invención, el tejido cartilaginoso se aísla de un sujeto humano. En humanos, la fuente preferida de tejido cartilaginoso radica en la articulación de la rodilla, siendo el método preferido de recolección de cartílago la toma de biopsia mediante artroscopia a partir de los márgenes del cóndilo femoral. Si las células de la presente invención van a ser trasplantadas en un sujeto humano, es preferible que el tejido cartilaginoso sea aislado de ese mismo sujeto para poder realizar un trasplante autólogo.

Los condrocitos pueden ser aislados a partir de una biopsia de cartílago usando diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. Normalmente se utiliza la digestión enzimática con colagenasa (Mitrovic *et al.*, 1979). En el Ejemplo 1 de la presente invención se detalla el procedimiento de aislamiento de células madre multipotentes a partir de condrocitos desdiferenciados humanos obtenidos de cartílago articular de rodilla.

Las células multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados pueden ser caracterizadas para identificar las proteínas intracelulares y/o de superficie, genes, y/o otros marcadores indicadores de su estado indiferenciado. Métodos utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a: inmunocitometría (ver Ejemplo 2), análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en microarrays, estudios proteómicos y análisis por *differential display*.

En otra realización de la invención, las células madre adultas multipotentes de la presente invención son inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada. Tales tipos celulares parcial o totalmente diferenciados incluyen, pero no se limitan a linajes celulares propios de los siguientes tejidos y órganos: cartílago, hueso, grasa, músculo, tejido nervioso, piel, hígado y páncreas, por ejemplo, condrocitos, osteocitos, adipocitos, miocitos, cardiomielocitos, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células epiteliales, hepatocitos, células pancreáticas, etc. Los métodos que se pueden usar para inducir la diferenciación de las células madre de la presente invención a diversos tipos celulares concretos son conocidos por los expertos en la materia y algunos de ellos se explican en detalle en los Ejemplos de la patente.

Las células diferenciadas total o parcialmente son caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y otros marcadores indicativos de diferenciación de las células madre de la presente invención a diversos linajes. Métodos utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a los siguientes: inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en microchips, estudios proteómicos y análisis por *differential display*.

12

En otro aspecto de la invención, las células madre de la presente invención, o células derivadas de las mismas, son modificadas genéticamente de forma estable o transitoria para que expresen genes exógenos o repriman la expresión de genes endógenos. Por tanto, la invención proporciona una población celular transgénica

5 aislada, derivada de las células madre adultas multipotentes procedentes de condrocitos desdiferenciados de mamífero proporcionadas por esta invención, cuyo genoma ha sido modificado por inserción de DNA aislado preseleccionado, por sustitución de un segmento del genoma celular con DNA aislado preseleccionado o por inactivación de al menos una porción del genoma celular. De acuerdo con este aspecto de la invención, las

10 células aisladas se ponen en contacto con un vector de transferencia génica, el cual comprende un ácido nucleico que incluye una secuencia genética heteróloga recombinante, de tal manera que el ácido nucleico es introducido en la célula bajo las condiciones apropiadas para que dicha secuencia sea expresada en el interior de la célula. El vector de transferencia génica puede ser viral o no viral. Existen numerosos

15 vectores virales y no virales para introducir DNA exógeno dentro de las células madre que son bien conocidos para aquellos expertos en la materia (Mulligan, 1993; Robbins *et al.*, 1997; Bierhuizen *et al.*, 1997). Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: vectores adenovirales (Kozarsky y Wilson, 1993), vectores adenoasociados (Muzyczka,

20 1992), vectores retrovirales (Tabin *et al.*, 1982), vectores lentivirales (Naldini *et al.*, 1996), vectores alfavirales (Huang, 1996), vectores herpesvirales (Carpenter y Stevens, 1996) y vectores derivados de coronavirus (Ortego *et al.*, 2002). Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: DNA desnudo (Wolff *et al.*, 1990), *gene gun*

25 (Johnston *et al.*, 1988), liposomas (Felgner *et al.*, 1987), poliaminas (Boussif *et al.*, 1995), péptidos (Wyman *et al.*, 1997), dendrímeros (Tang *et al.*, 1996), glicopolímeros catiónicos (Roche *et al.*, 2003), complejos liposoma-policatión (Tsai *et al.*, 1996), proteínas (Fisher y Wilson, 1997) y sistemas de transferencia génica mediados por receptor (Cotten *et al.*, 1990). La secuencia genética heteróloga recombinante está

30 normalmente incluida en un casete de expresión, que consta de una secuencia codificante asociada operativamente a un promotor u otras secuencias en *cis* que permitan su expresión. La secuencia codificante puede codificar una proteína o puede codificar RNA biológicamente activo, como puede ser RNA antisentido (Spampinato *et*

al., 1992), una ribozima (Leavitt *et al.*, 1994) o siRNA (Qin *et al.*, 2003). En una realización preferida, las células madre de la presente invención son modificadas genéticamente para expresar un gen potencialmente terapéutico.

- 5 Las células madre de la presente invención, sin modificar o genéticamente modificadas, así como aquellas células derivadas de las anteriores que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, estando éstas sin modificar o genéticamente modificadas, pueden ser utilizadas para preparar composiciones farmacéuticas. En la preparación de dichas composiciones farmacéuticas, las células de
10 la presente invención se pueden utilizar solas o dentro de composiciones biológicamente compatibles, las cuales pueden incluir, pero no están limitadas a: factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, proteínas de la matriz extracelular, fármacos y polímeros sintéticos. Por tanto, en una realización particular de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de células
15 madre proporcionada por la presente invención, sin modificar o genéticamente modificadas, o que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, sin modificar o genéticamente modificadas, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica puede contener, además, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas,
20 proteínas de la matriz extracelular, fármacos y/o polímeros sintéticos. En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas preparadas a partir de las células de la presente invención tienen la forma de una estructura tridimensional en la cual las células y otros posibles componentes se hallan incluidos dentro de una matriz sintética tridimensional biocompatible. Alternativamente, dichas
25 composiciones farmacéuticas son del tipo micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera.

- Los implantes anteriormente descritos pueden ser utilizados en procedimientos de trasplante autólogo y alogénico. Estos procedimientos de trasplante pueden ser
30 llevados a cabo administrando los implantes a un paciente de diversas formas. Las formas de administración preferidas incluyen pero no están limitadas a: parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca,

intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutanea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

5

En una realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el cartílago, y la característica deseada o fenotipo es el condroblástico. En una segunda realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el hueso, y la característica deseada o fenotipo es el osteoblástico. En una tercera realización preferida 10 de la invención, el lugar de trasplante es el músculo esquelético, y la característica deseada o fenotipo es el mioblástico. En una cuarta realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el músculo cardíaco, y la característica deseada o fenotipo es el cardiomiooblástico. En una quinta realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el sistema nervioso periférico, y la característica deseada o 15 fenotipo es el glial. En una sexta realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el sistema nervioso central, y la característica deseada o fenotipo es el neuronal. En una séptima realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es la piel, y la característica deseada o fenotipo es el epitelial. En una octava realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el hígado, y la característica deseada 20 o fenotipo es el hepatocítico. En una novena realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el hígado, y la característica deseada o fenotipo es el de célula pancreática. En una décima realización preferida de la invención, el lugar de trasplante es el páncreas, y la característica deseada o fenotipo es el de célula pancreática.

25

El uso terapéutico preferido de las células descritas en la presente invención pretende ser el tratamiento de enfermedades degenerativas, traumáticas, genéticas, infecciosas o neoplásicas humanas que resulten en un daño o disfunción de tejidos u órganos que incluyan, pero no estén limitados a: fistulas, úlceras, lesiones del cartílago, lesiones óseas, lesiones musculares, desórdenes musculares (incluyendo, pero sin estar 30 limitados a distrofia muscular), enfermedades óseas (incluyendo, pero sin estar limitadas a osteogénesis imperfecta), lesiones miocárdicas, desórdenes neurodegenerativos (incluyendo, pero sin estar limitados a: enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer), lesiones espinales, daño

nervioso, lesiones vasculares, lesiones de la piel, daño hepático y diabetes. Realizaciones preferidas de las células modificadas genéticamente de la invención incluyen, pero no se limitan a: terapia de sustitución enzimática, sustitución de células y tejidos dañados, corrección de mutaciones genéticas deletéreas, terapia antiangiogénica, 5 terapia proangiogénica, terapia antiinflamatoria, liberación de compuestos bioactivos y liberación de agentes antitumorales.

Por tanto, en una realización particular, la invención se relaciona con el uso de una población de células madre proporcionada por la presente invención, sin modificar 10 o genéticamente modificadas, o que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, sin modificar o genéticamente modificadas, para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas y genéticas de cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central y periférico, piel, hígado y páncreas. A modo ilustrativo, dicha población celular aislada proporcionada por esta invención puede ser utilizada para preparar una composición 15 farmacéutica adecuada para el tratamiento de lesiones del cartílago, o de lesiones óseas, o de lesiones musculares, o de lesiones cardíacas, o de lesiones del sistema nervioso periférico, o de lesiones del sistema nervioso central, o de lesiones de la piel, o de lesiones hepáticas, o de lesiones pancreáticas, así como para el tratamiento de 20 enfermedades degenerativas del cartílago, o enfermedades degenerativas del tejido óseo, o enfermedades degenerativas del tejido muscular, o enfermedades degenerativas del corazón, o enfermedades degenerativas del sistema nervioso periférico, o enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, o enfermedades degenerativas de la piel, o enfermedades degenerativas hepáticas, o enfermedades degenerativas del páncreas, o 25 bien para el tratamiento de enfermedades genéticas del cartílago, o de enfermedades genéticas del tejido óseo, o de enfermedades genéticas del tejido muscular, o de enfermedades genéticas del corazón, o de enfermedades genéticas del sistema nervioso periférico, o de enfermedades genéticas del sistema nervioso central, o de enfermedades genéticas de la piel, o de enfermedades genéticas del hígado, o de enfermedades 30 genéticas del páncreas.

La presencia en el sujeto, al que se le ha realizado el trasplante, de células diferenciadas procedentes de las células madre aisladas multipotentes de la presente invención, podría ser detectada mediante diversas técnicas entre las que se incluyen pero no se limitan a: imagen *in vivo*, análisis por citometría de flujo, análisis por PCR, 5 análisis por *southern blot* y estudios inmunohistoquímicos.

En otro aspecto de la invención, las células madre de la presente invención, con o sin modificaciones genéticas, así como las células derivadas de las anteriores que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, con o sin 10 modificaciones genéticas, pueden ser aplicadas al desarrollo de ensayos *in vitro* e *in vivo* con los siguientes propósitos industriales: búsqueda de fármacos, estudios farmacológicos, estudios toxicológicos, estudios farmacogenómicos y estudios genéticos. Tales ensayos pueden ser utilizados para la identificación y/o caracterización de una multitud de dianas biológicas, compuestos bioactivos o agentes farmacológicos. 15

Las células madre de la presente invención proporcionan un sistema único en el cual las células pueden diferenciarse para dar lugar a linajes específicos del mismo individuo. Además, las células de la presente invención proporcionan una fuente de 20 células en cultivo a partir de una potencial variedad de individuos genéticamente diversos que pueden responder de distinta manera a diversos agentes biológicos y farmacológicos. Al comparar las respuestas de las células procedentes de una población estadísticamente significativa de individuos se pueden determinar los efectos de los agentes biológicos o farmacológicos ensayados sobre el tipo celular concreto. A diferencia de la mayoría de los cultivos primarios, las células de la presente invención 25 se pueden mantener en cultivo y de esta forma se pueden estudiar según vaya transcurriendo el tiempo. Por lo tanto, múltiples cultivos celulares del mismo o distintos individuos pueden ser tratados con el agente de interés para determinar si existen diferencias en el efecto que tiene dicho agente en ciertos tipos de células con el mismo perfil genético o, alternativamente, en tipos celulares similares procedentes de 30 individuos genéticamente distintos.

La utilización de las células madre de la presente invención en un sistema de escrutinio de alto rendimiento (*high-throughput screening*) permite analizar una amplia gama de agentes biológicos y farmacológicos, así como bibliotecas combinatoriales de los mismos, de una forma efectiva en cuanto a tiempo y dinero, para de esta forma 5 elucidar sus efectos en las células humanas. Dichos agentes incluyen, pero no están limitados a: péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, hormonas, partículas virales, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimoterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas y preparados de vacunas.

10

En el campo de la farmacogenómica, se pueden usar las células madre de la presente invención aisladas de una población estadísticamente significativa de individuos para proporcionar un sistema ideal para identificar polimorfismos asociados con respuestas positivas o negativas a un abanico de sustancias. La información 15 obtenida de estos estudios puede tener amplias repercusiones en el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y diversas enfermedades metabólicas.

El método *in vitro* que permite utilizar las células madre de la presente invención para evaluar la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos, o a bibliotecas 20 combinatoriales de dichos agentes, comprende lo siguiente:

- a) aislar las células proporcionadas por la presente invención a partir de un individuo o de una población estadísticamente significativa de los mismos;
- b) diferenciar opcionalmente las células aisladas a un tipo celular concreto;
- c) expandir las células en cultivo;
- d) diferenciar opcionalmente las células expandidas a un tipo celular concreto;
- e) poner en contacto el cultivo con uno o más agentes biológicos o farmacológicos o con una biblioteca combinatorial de dichos agentes; y
- f) evaluar los posibles efectos biológicos de dichos agentes sobre las células del cultivo.

30

Alternativamente, para la puesta en práctica de dicho método, pueden utilizarse células madre proporcionadas por la presente invención, opcionalmente modificadas genéticamente, o bien células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, opcionalmente modificadas genéticamente.

5

En el método anteriormente descrito, los agentes biológicos o farmacológicos que pueden evaluarse incluyen, aunque sin limitarse exclusivamente a ellos, péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, fármacos, por ejemplo, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, composiciones farmacéuticas, preparados vacunales, proteínas de la matriz extracelular, polímeros sintéticos, compuestos inhibitorios, mutágenos, aditivos alimentarios, etc.

10 El método *in vivo* que permite utilizar las células madre de la presente invención para evaluar la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos, o a bibliotecas combinatoriales de dichos agentes, comprende lo siguiente:

- a) aislar las células de la presente invención a partir de un individuo o de una población estadísticamente significativa de los mismos;
- 15 b) diferenciar opcionalmente las células aisladas a un tipo celular concreto;
- c) expandir las células en cultivo;
- d) diferenciar opcionalmente las células expandidas a un tipo celular concreto;
- e) implantar las células, solas o dentro de composiciones biológicamente compatibles, en un modelo de animal experimental;
- 20 f) administrar a los animales injertados uno o más agentes biológicos o farmacológicos; y
- g) evaluar los posibles efectos biológicos de dichos agentes sobre las células implantadas.

30 Alternativamente, para la puesta en práctica de dicho método, pueden utilizarse células madre proporcionadas por la presente invención, opcionalmente modificadas genéticamente, o bien células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada, opcionalmente modificadas genéticamente.

En el método anteriormente descrito, el animal experimental puede ser, pero no está limitado a, una cepa de ratón inmunodeficiente. En el mismo método, las composiciones biológicamente compatibles pueden incluir, de forma no limitante, los siguientes tipos de sustancias: péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, fármacos, por ejemplo, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, composiciones farmacéuticas, preparados vacunales, proteínas de la matriz extracelular, polímeros sintéticos, compuestos inhibitorios, mutágenos, aditivos alimentarios, etc.. En una realización preferida de la invención, las células son implantadas en el animal experimental incluidas en una matriz sintética tridimensional biocompatible. En otra realización de la invención, las células se introducen en el animal incluidas en una estructura del tipo micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera. Las formas de implantación preferidas de dichas células, composiciones y estructuras en el animal experimental incluyen pero no están limitadas a las siguientes: parenteral, intraperitoneal, 5 intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un suppositorio, percutanea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, 10 bomba de infusión o vía catéter.

15

10

15

20

A continuación, los Ejemplos describen en un mayor detalle ciertas realizaciones de la presente invención.

25 EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos se presentan para ilustrar pero no limitan la presente invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados obtenidos a partir de cartílago articular humano.

30 Se comienza obteniendo mediante procedimiento artroscópico una biopsia de cartílago de los márgenes externos del cóndilo femoral. El tamaño de dicha biopsia puede ser variable, en función de la estructura de la articulación, la edad del paciente y el criterio del cirujano, pero normalmente no es inferior a 4 cm². La biopsia se recoge en

una solución salina estéril y se mantiene a 4°C hasta el momento del procesamiento, que no debe ser posterior a las 48 horas de la toma de la muestra.

La biopsia de cartílago se suspende en 1 mililitro de medio de cultivo basal
5 estéril (DMEM, Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco), conteniendo L-Glutamina 2 mM, antibióticos y un 1% de suero fetal bovino (FBS). El suero también puede ser de origen humano, preferiblemente de origen autólogo. A continuación, el cartílago se tritura utilizando unas tijeras quirúrgicas bajo condiciones asépticas. Los fragmentos de cartílago resultantes se adicionan a una suspensión conteniendo un 0,1%
10 de colagenasa en el mismo medio que se utilizó para la trituración, y la suspensión celular resultante se incuba durante al menos 4 horas a 37°C con agitación suave. Después, se filtra la suspensión celular resultante a través de una malla estéril de 40 micrómetros y posteriormente se centrifuga la suspensión filtrada a 500 g durante 5 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende en medio de cultivo y se cultiva
15 a una densidad aproximada de 20.000 células/cm² en frascos para el cultivo de tejidos. Normalmente, el medio de cultivo está compuesto de un medio basal como puede ser el DMEM, L-Glutamina 2 mM, 10% FBS y antibióticos (Choi *et al.*, 1980; Webber y Sokoloff, 1981). Otra posibilidad es usar suero humano procedente de una fuente autóloga, en vez de suero bovino. Otra posibilidad radica en usar un medio de cultivo definido, que contenga un medio basal como DMEM, RPMI, F12 o una combinación de los mismos, L-Glutamina 2 mM, antibióticos, y un medio suplementario que incluya, pero sin limitarse únicamente a esto, lo siguiente: insulina, transferrina, selenio, albúmina y ácido linoleico (Kato *et al.*, 1980; Schwartz y Sugumaran, 1982; Jennings *et al.*, 1983; Adolphe *et al.*, 1984; Quarto *et al.*, 1997; Patente US 6.150.163).

20

25

Posteriormente, las células se cultivan en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad. Después de cuatro días en cultivo, se retira el medio, se eliminan las células no adheridas mediante lavado con tampón fosfato salino (PBS) y se añade medio fresco. Después de otros cuatro días, se vuelven a lavar las células y se desprenden incubándolas con una solución que contenga un 0,25% de tripsina y un 0,02% de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Se centrifugan las células despegadas para precipitarlas y se cultivan a una densidad de 5.000 células/cm² en

frascos de cultivo nuevos. Se mantienen las células en cultivo en monocapa en un estado de subconfluencia mediante su desprendimiento y recultivo a 5.000 células/cm². Las células adheridas resultantes son células madre aisladas multipotentes que pueden mantenerse desdiferenciadas en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. La 5 Figura 1 muestra una fotomicrografía de dichas células, tras 15 días en cultivo.

Ejemplo 2: Caracterización inmunofenotípica de las células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos.

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados son recogidas 10 mediante digestión suave con tripsina, lavadas con PBS e incubadas durante 30 minutos a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos marcados con FITC o PE: CD9, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD29, CD31, CD34, CD36, CD38, CD44, CD45, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD50, CD51, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD71, CD90, CD95, 15 CD102, CD104, CD105, CD106, CD117, CD133, CD166, HLA-I, HLA-II y beta2-microglobulina.

Las células marcadas se lavan y se analizan inmediatamente usando un citómetro Epics-XL (Coulter). Como controles, se utilizaron células teñidas con anticuerpos 20 inespecíficos de los correspondientes isotypos marcados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). La Figura 2A muestra los histogramas que indican un marcaje positivo de las células, mientras que la Figura 2B muestra los histogramas que indican la ausencia del antígeno correspondiente.

25 **Ejemplo 3: Diferenciación *in vitro* de células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos a células de fenotipo óseo.**

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se siembran a una densidad de 20.000 células/cm² en medio de cultivo estándar (DMEM, 10% FBS, L-Glutamina 2 mM y antibiótico). A las 12 horas se reemplaza el medio de cultivo por 30 medio inductor de osteogénesis (Jaiswal *et al.*, 1997) compuesto por:

- α MEM

22

- 20% FBS
- Penicilina/streptomicina
- L-Glutamina 2mM
- Dexametasona 0,01 µM
- 5 - Acido ascórbico 0,2mM
- β-Glicerofosfato 10mM

A los 14 días se puede observar que hay depósitos mineralizados de fosfato cárneo, lo que indica la presencia de nódulos óseos. Tales nódulos se detectan mediante una tinción con Alizarin Red (Standford et al., 1995) como se detalla a continuación: se elimina el medio y lavar con PBS; se fijan las muestras con Etanol 70% durante 1 hora a 4°C; se tifice la muestra con 1 ml de Alizarin Red 40 mM pH 4,1 y se elimina el colorante a los 5 minutos con abundante agua. La Figura 3A muestra el resultado obtenido tras la tinción de las células diferenciadas, mientras que la Figura 3B muestra el resultado de la tinción de las células sin diferenciar.

Ejemplo 4: Diferenciación *in vitro* de células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos a células de fenotipo muscular.

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se siembran a una densidad de 10.000 células/cm² en medio de cultivo estándar (DMEM, 10% FBS, L-Glutamina 2 mM y antibiótico). Tras 12 horas, se reemplaza el medio de cultivo por medio inductor de miogénesis (Wakitani et al., 1995), compuesto por:

- DMEM
- 2% FBS
- 25 - Penicilina/estreptomicina
- L-Glutamina 2 mM
- Ascorbato-2-fosfato 0,1 mM
- Dexametasona 0,01 µM
- ITS+1 (Sigma-Aldrich)
- 30 - 5-Azacitidina 3 µM

Tras 24 horas, se remplaza el medio por medio de cultivo estándar, y se mantienen las células en cultivo durante 2-3 semanas, cambiando el medio dos veces por semana. Tras ese tiempo, las células adquieren un fenotipo alargado, forman estructuras fibrilares y pueden observarse algunas fusiones celulares. Para detectar el 5 fenotipo de mioblasto, las células obtenidas se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4% y se incuban con un anticuerpo frente a la cadena pesada de la miosina, que es un antígeno específico de músculo. La Figura 4A muestra el resultado obtenido tras la tinción de las células diferenciadas, mientras que la Figura 4B muestra el resultado de la tinción de las células sin diferenciar.

10

Ejemplo 5: Diferenciación *in vitro* de células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos a células de fenotipo neuronal.

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se siembran a baja densidad en medio de cultivo estándar (DMEM, 10% FBS, L-Glutamina 2 mM y 15 antibiótico) suplementado con 10 ng/ml bFGF y se incuba durante 24-36 horas de modo que se alcanza una alta confluencia celular. A continuación se lava y se añade medio neuroinductor (Black y Woodbury, 2001), compuesto por:

20

- α MEM
- BHA 200μM
- Penicilina/streptomicina
- L-Glutamina 2 mM
- Foskolina 10 μM
- 2% DMSO
- Hidrocortisona 1 μM
- Insulina 5 μg/ml
- C1K 25 mM
- Ácido Valproico 2 mM

25

A las pocas horas de la inducción se puede observar un cambio morfológico en 30 el que las células adquieren un cuerpo celular redondeado y muy refringente, y unas prolongaciones que se asemejan a los axones y las dendritas de las células nerviosas.

Tras 3 días, las células obtenidas se fijan con PFA al 4% y se incuban con anticuerpos frente a los antígenos específicos de neuronas NF-200 y TuJ1. Mediante este procedimiento se observa un 30% de células positivas para NF-200 (Figura 5A) y un 75% de células positivas para TuJ1 (Figura 5B).

5 **Ejemplo 6: Demostración de la multipotencialidad clonal de las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos.**

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se siembran en placas de 96 pocillos a razón de una célula por pocillo, aplicando el método de dilución límite, en medio de cultivo estándar (DMEM, 10% FBS, L-Glutamina 2 mM y 10 antibiótico). A las 2 horas se confirma mediante observación al microscopio la presencia de una sola célula en cada pocillo y se descartan aquellos pocillos en los que haya más de una o ninguna célula. Los cultivos se dejan evolucionar hasta que se alcanza una confluencia celular alta, realizando cambios de medio de cultivo 2 veces 15 por semana. Los clones se van subcultivando en una superficie mayor a medida que se va alcanzando una confluencia celular alta. La eficiencia de clonaje está comprendida entre un 50-60%. No se aprecian diferencias morfológicas entre los diferentes clones obtenidos. Una vez expandidos los clones, se lleva a cabo con los mismos diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

20 1. Diferenciación osteogénica. Se lleva a cabo como se describe en el Ejemplo 3.

25 2. Diferenciación adipogénica. Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se siembran a una densidad de 20.000 células/cm² en medio de cultivo estándar (DMEM, 10% FBS, L-Glutamina 2 mM y antibiótico). A las 12 horas se añade el medio inductor de adipogénesis (Pittenger *et al.*, 1999) compuesto por:

- α MEM
- 20% FBS
- Penicilina/streptomicina
- L-Glutamina 2 mM
- Hidrocortisona 0,5 µM
- IBMX 0,5 mM
- Indometacina 60 µM

30

A los 14 días de la diferenciación se puede observar que hay vacuolas lipídicas citoplasmáticas, características de células adiposas. Tales vacuolas se detectan mediante una tinción con Red Oil (Ramírez-Zacarías *et al.*, 1992) como se detalla a continuación: tras eliminar el medio y lavar con PBS, se fijan las muestras con formalina de 30 a 60 5 minutos a temperatura ambiente; se lava con agua; se incuba con isopropanol al 60% durante 3 minutos; se elimina el isopropanol y se añade la solución Red Oil dejándola 5 minutos, tras los que se elimina lavando con abundante agua.

3. Diferenciación condrogénica. Se parte de 5×10^5 células, que se sedimentan 10 mediante centrifugación a 400 g x 5 minutos en un tubo cónico de polipropileno. A continuación se incuban en 2 ml de medio de cultivo estándar (DMEM, 10% suero fetal bovino, L-Glutamina 2 mM y antibiótico) y a las 24 horas se puede ver como se ha formado una estructura a modo de esfera compacta que ya no está adherida a la base del tubo. Se mantiene así en cultivo, realizando una sustitución del medio 2 veces por 15 semana. A las 2 semanas, tras realizar un lavado con PBS, se fijan los agregados celulares con una solución de paraformaldehido al 4% durante 90 minutos a temperatura ambiente. Despues se procede a su inclusión en parafina. Los bloques con las muestras incluidas se cortan a un grosor de 4 μm con un microtomo. Para poner de manifiesto la presencia de proteoglicanos propios de este tipo de tejido se realiza una tinción con 20 Alcian Blue (Lev *et al.*, 1964) como se detalla a continuación: las muestras son desparafinadas e hidratadas y teñidas con una solución de Alcian Blue preparada en ácido clorhídrico 0,1 N durante 30 minutos; después se vuelven a deshidratar y se montan con un medio resinoso. Como resultado del proceso se pueden visualizar los proteoglicanos sulfatados teñidos de azul. Además se realizó inmunofluorescencia 25 contra la molécula de colágeno tipo II, que es expresada por las células condrocíticas siendo uno de los principales componentes de la matriz extracelular del cartílago.

El resultado del experimento demuestra que un porcentaje muy alto (33%) de los clones obtenidos son multipotentes (ver Figura 6).

Ejemplo 7: Expresión mediante transducción retroviral de un gen heterólogo en células madre multipotentes derivadas de condrocitos desdiferenciados humanos.

Las células madre derivadas de condrocitos desdiferenciados se plaquean a 15.000 células/cm² y se incuban a 37°C durante 6 h con una preparación de partículas retrovirales empaquetadas con envuelta anfotrópica codificando la proteína verde fluorescente (GFP). Después de la infección, las células son lavadas con tampón fosfato y mantenidas en el medio de cultivo habitual. Tras 48 h, la expresión de GFP puede ser analizada mediante microscopía de fluorescencia (ver Figura 7A) o mediante citometría de flujo (ver Figura 7B).

Referencias citadas**PATENTES**

- | | |
|-----------------|-----------------------------|
| US 6.150.163 | McPherson <i>et al.</i> |
| US 5.811.094 | Binette <i>et al.</i> |
| 5 US 5.958.767 | Kim <i>et al.</i> |
| US 6.328.960 | Klyushnenkova <i>et al.</i> |
| US 6.379.953 | Bruder <i>et al.</i> |
| US 6.497.875 | Sorrell <i>et al.</i> |
| US 6.294.346 | Reinolds <i>et al.</i> |
| 10 US 6.200.806 | Thomson <i>et al.</i> |
| US 5.486.359 | Haynesworth <i>et al.</i> |
| WO 03/022988 | Futrell <i>et al.</i> |
| WO 01/11011 | Reyes <i>et al.</i> |

OTROS DOCUMENTOS

- | | |
|----|---|
| 15 | Adolphe, M. <i>et al.</i> (1984) <i>Exp Cell Res</i> 155: 527-536. |
| | Barr, R.D. y McBride, J.A. (1982) <i>Br J Haematol</i> 51: 181-187. |
| | Benya, P.D. y Nimni, M.E. (1979) <i>Arch Biochem Biophys</i> 192: 327-335. |
| | Benya, P.D. <i>et al.</i> (1977) <i>Biochemistry</i> 16: 865-872. |
| | Benya, P.D. <i>et al.</i> (1978) <i>Cell</i> 15: 1313-1321. |
| 20 | Benya, P.D. y Shaffer, J.D. (1982) <i>Cell</i> 30: 215-224. |
| | Bhatia, M. <i>et al.</i> (1997) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 94: 5320-5325. |
| | Bierhuizen, M.F. <i>et al.</i> (1997) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 234: 371-375. |
| | Black, I.B. y Woodbury, D. (2001) <i>Blood Cells Mol Dis</i> 27(3): 632-636. |
| | Boussif, O. <i>et al.</i> (1995) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 92: 7297-7301. |
| 25 | Broxmeyer, H.E. <i>et al.</i> (1989) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 86: 3828-3832. |
| | Carpenter, D.E. y Stevens, J.G. (1996) <i>Hum Gene Ther</i> 7: 1447-1454. |
| | Choi, Y.C. <i>et al.</i> (1980) <i>Connect Tissue Res</i> 7: 105-112. |
| | Cotten, M. <i>et al.</i> (1990) <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 87: 4033-4037. |
| | Daniels, J.T. <i>et al.</i> (2001) <i>Wound Repair Regen</i> 9: 483-494. |
| 30 | Doetsch, F. <i>et al.</i> (1999) <i>Cell</i> 97: 703-716. |
| | Elimä, K. y Vuorio, E. (1989) <i>FEBS Lett</i> 258: 195-198. |
| | Evans, M.J. y Kaufman, M.H. (1981) <i>Nature</i> 292: 154-156. |

- Evans *et al.* (1992) J Am Med Assoc 267: 239-246
- Felgner, P.L. *et al.* (1987) Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7413-7417.
- Finer, M.H. *et al.* (1985) Mol Cell Biol 5: 1415-1424.
- Fisher, K.J. y Wilson, J.M. (1997) Biochem J 321 (Pt 1): 49-58.
- 5 Forbes, S. *et al.* (2002) J Pathol 197: 510-518.
- Fridenshtein, A. (1982) Arkh Patol 44: 3-11.
- Fuchs, E. y Segre, J.A. (2000) Cell 100: 143-155.
- Gage, F.H. (2000) Science 287: 1433-1438.
- Gronthos, S. *et al.* (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13625-13630.
- 10 Grounds, M.D. *et al.* (1992) Cell Tissue Res 267: 99-104.
- Hegert, C. *et al.* (2002) J Cell Sci 115: 4617-4628.
- Huang, H.V. (1996) Curr Opin Biotechnol 7: 531-535.
- Ivanova, N.B. *et al.* (2002) Science 298: 601-604.
- Jaiswal, N., *et al.* (1997) J Cell Biochem 64: 295-312.
- 15 Jayawickreme, C.K. y Kost, T.A. (1997) Curr Opin Biotechnol 8: 629-634.
- Jennings, S.D. y Ham, R.G. (1983) Cell Biol Int Rep 7: 149-159.
- Jiang, Y. *et al.* (2002) Nature 418: 41-49.
- Jiang, Y. *et al.* (2002) Exp Hematol 30: 896-904.
- Johansson, C.B. *et al.* (1999) Cell 96: 25-34.
- 20 Johnston, S.A. *et al.* (1988) Science 240: 1538-1541.
- Joshi, C.V. y Enver, T. (2002) Curr Opin Cell Biol 14: 749-755.
- Kato, Y. *et al.* (1980) Exp Cell Res 125: 167-174.
- Kozarsky, K.F. y Wilson, J.M. (1993) Curr Opin Genet Dev 3: 499-503.
- Leavitt, M.C. *et al.* (1994) Hum Gene Ther 5: 1115-1120.
- 25 Lev, R., *et al.* (1964) J Histochem Cytochem 12:309.
- Mankin, H.J. y Brandt, K.D. (1984) en "Osteoarthritis" ed. Moskowitz, *et al.*, WB Saunders, Filadelfia, pp. 43-79.
- Maroudas, N.G. (1979) J Theor Biol 79: 101-116.
- Marshman, E. *et al.* (2002) Bioessays 24: 91-98.
- 30 Mayne, R. *et al.* (1976) Proc Natl Acad Sci U S A 73: 1674-1678.
- McKay, R. (1997) Science 276: 66-71.
- Mitrovic, D. *et al.* (1979) J Rheumatol 6: 124-130.
- Miura, M. *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100: 5807-5812.

- Mulligan, R.C. (1993) *Science* 260: 926-932.
- Muzyczka, N. (1992) *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129.
- Naldini, L. *et al.* (1996) *Science* 272: 263-267.
- Ortego, J. *et al.* (2002) *J Virol* 76: 11518-11529.
- 5 Osawa, M. *et al.* (1996) *Science* 273: 242-245.
- Patience, C. *et al.* (1997) *Nat Med* 3: 282-286.
- Phillips, R.L. *et al.* (2000) *Science* 288: 1635-1640.
- Pittenger, M.F. *et al.* (1999) *Science* 284: 143-147.
- Prockop, D.J. (1997) *Science* 276: 71-74.
- 10 Qin, X.F. *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 183-188.
- Quarto, R. *et al.* (1995) *Calcif Tissue Int* 56: 123-129.
- Ramalho-Santos, M. *et al.* (2002) *Science* 298: 597-600.
- Ramirez-Zacarias, J.L. *et al.* (1992) *Histochemistry* 97: 493-497.
- Reyes, M. y Verfaillie, C.M. (2001) *Ann N Y Acad Sci* 938: 231-233; discussion 233-235.
- 15 Robbins, P.B. *et al.* (1997) *J Virol* 71: 9466-9474.
- Roche, A.C. *et al.* (2003) *Cell Mol Life Sci* 60: 288-297.
- Russell, N.H. y Hunter, A.E. (1994) *Bone Marrow Transplant* 13: 353-355.
- Schwartz, E.R. y Sugumaran, G. (1982) *In Vitro* 18: 254-260.
- 20 Spampinato, S. *et al.* (1992) *Pharmacol Res* 25 Suppl 1: 51-52.
- Spangrude, G.J. *et al.* (1988) *Science* 241: 58-62.
- Stanford, C.M. *et al.* (1995) *J Biol Chem* 270: 9420-9428.
- Tabin, C.J. *et al.* (1982) *Mol Cell Biol* 2: 426-436.
- Tallheden, T. *et al.* (2003) *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2: 93-100.
- 25 Tang, M.X. *et al.* (1996) *Bioconjug Chem* 7: 703-714.
- Thomson, J.A. *et al.* (1998) *Science* 282: 1145-1147.
- Toma, J.G. *et al.* (2001) *Nat Cell Biol* 3: 778-784.
- Tsai, J.T. *et al.* (2002) *Biotechnol Appl Biochem* 36: 13-20.
- von der Mark, K. *et al.* (1977) *Nature* 267: 531-532.
- 30 Wakitani S. *et al.* (1995) *Muscle Nerve* 18: 1417-1426.
- Watt, F.M. (2001) *Curr Opin Genet Dev* 11: 410-417.
- Webber, R.J. y Sokoloff, L. (1981) *Growth* 45: 252-268.
- Wilson, C.A. *et al.* (1998) *J Virol* 72: 3082-3087.

30

- Wolff, J.A. *et al.* (1990) *Science* 247: 1465-1468.
Wyman, T.B. *et al.* (1997) *Biochemistry* 36: 3008-3017.
Zuk, P.A. *et al.* (2002) *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.
Zuk, P.A. *et al.* (2001) *Tissue Eng* 7: 211-228.

5

REIVINDICACIONES

1. Población aislada de células madre adultas multipotentes, procedentes de condrocitos desdiferenciados de cartílago articular de mamífero, caracterizada por ser positiva para los siguientes antígenos de superficie:
5 CD9, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90, CD95, CD105, CD106, CD166, HLA-I y beta2-microglobulina.
2. Población aislada de células madre adultas multipotentes, según la reivindicación 1, caracterizada por ser negativa para los siguientes antígenos
10 de superficie: CD10, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD51, CD56, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD71, CD102, CD104, CD117, CD133 y HLA-II.
3. Población aislada de células madre adultas multipotentes, según la reivindicación 1, caracterizada porque las células son de origen humano.
15
4. Población celular aislada, derivada de una población aislada de células madre adultas multipotentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada.
20
5. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un condrocito.
6. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un osteocito.
25
7. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un adipocito.
8. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un miocito.
9. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un cardiomiocto.
30
10. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una neurona.

32

11. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un astrocito.
12. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un oligodendrocito.
- 5 13. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una célula epitelial.
14. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de un hepatocito.
- 10 15. Población celular aislada, según la reivindicación 4, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una célula pancreática.
16. Población celular transgénica aislada, derivada de la población celular aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada porque su genoma ha sido modificado por inserción de DNA aislado preseleccionado, por sustitución de un segmento del genoma celular con DNA aislado preseleccionado o por inactivación de al menos una porción del genoma celular.
- 15 17. Población celular transgénica aislada, según la reivindicación 16, caracterizada porque su genoma ha sido modificado mediante transducción no viral.
- 20 18. Población celular transgénica aislada, según la reivindicación 16, caracterizada porque su genoma ha sido modificado mediante transducción viral.
19. Uso de una población celular aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas y genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central y periférico, piel, hígado y páncreas.
- 25 20. Una composición farmacéutica que comprende una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende, además, un componente adicional seleccionado entre factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, proteínas de la matriz extracelular, fármacos, polímeros sintéticos y sus mezclas.
- 5 22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, en la que dichas células y, opcionalmente, dicho componente adicional, están incluidas en una matriz sintética tridimensional biocompatible.
- 10 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, en la que dicha estructura tridimensional biocompatible es del tipo micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera.
24. Método para evaluar *in vitro* la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos, o a bibliotecas combinatoriales de dichos agentes, que comprende:
 - a) aislar una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 a partir de un individuo o de una población estadísticamente significativa de los mismos;
 - b) diferenciar opcionalmente las células aisladas a un tipo celular concreto;
 - c) expandir las células en cultivo;
 - d) diferenciar opcionalmente las células expandidas a un tipo celular concreto;
 - e) poner en contacto el cultivo con uno o más agentes biológicos o farmacológicos o con una biblioteca combinatorial de dichos agentes; y
 - f) evaluar los posibles efectos biológicos de dichos agentes sobre las células del cultivo.
- 20 25. Método según la reivindicación 24, en el que dichos agentes biológicos o farmacológicos a evaluar comprenden péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimoterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas y preparados vacunales.

26. Método para evaluar *in vivo* la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos, o a bibliotecas combinatoriales de dichos agentes, caracterizado porque comprende:

- a) aislar una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 18 a partir de un individuo o de una población estadísticamente significativa de los mismos;
- b) diferenciar opcionalmente las células aisladas a un tipo celular concreto;
- c) expandir las células en cultivo;
- d) diferenciar opcionalmente las células expandidas a un tipo celular 10 concreto;
- e) implantar las células, solas o dentro de composiciones biológicamente compatibles, en un modelo de animal experimental;
- f) administrar a los animales implantados uno o más agentes biológicos o farmacológicos; y
- 15 g) evaluar los posibles efectos biológicos de dichos agentes sobre las células implantadas.

27. Método según la reivindicación 26, en el que el animal experimental utilizado es una cepa de ratón inmunodeficiente.

28. Método según la reivindicación 26, en el que las células se implantan en el 20 animal experimental incluidas dentro de una matriz tridimensional biocompatible.

29. Método según la reivindicación 26, en el que las células se implantan en el animal experimental incluidas dentro de una estructura del tipo micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera.

30. Método según la reivindicación 26, en el que los agentes biológicos o 25 farmacológicos a evaluar comprenden péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimoterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas y preparados de vacunas.

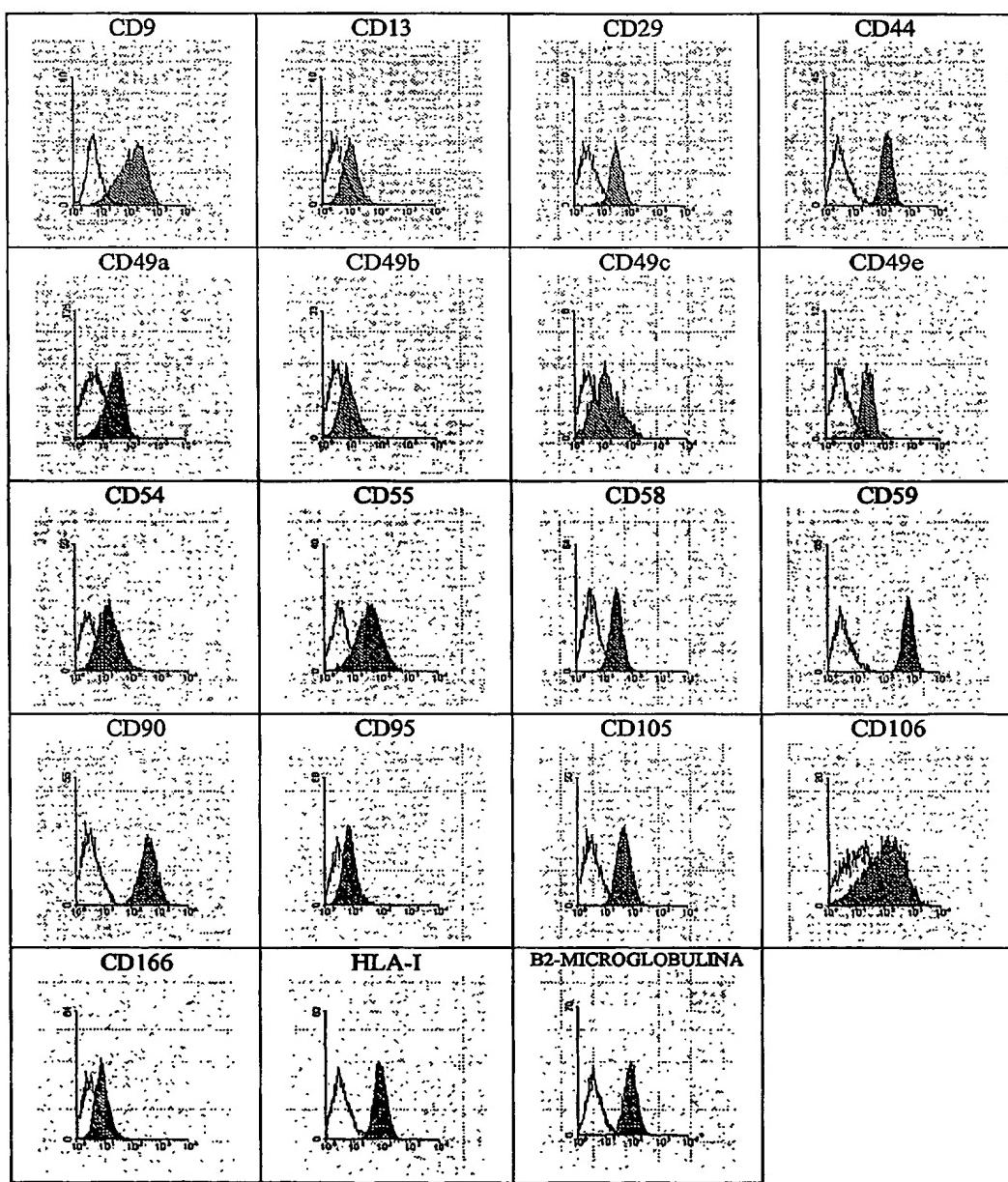
1/9

FIGURA 1

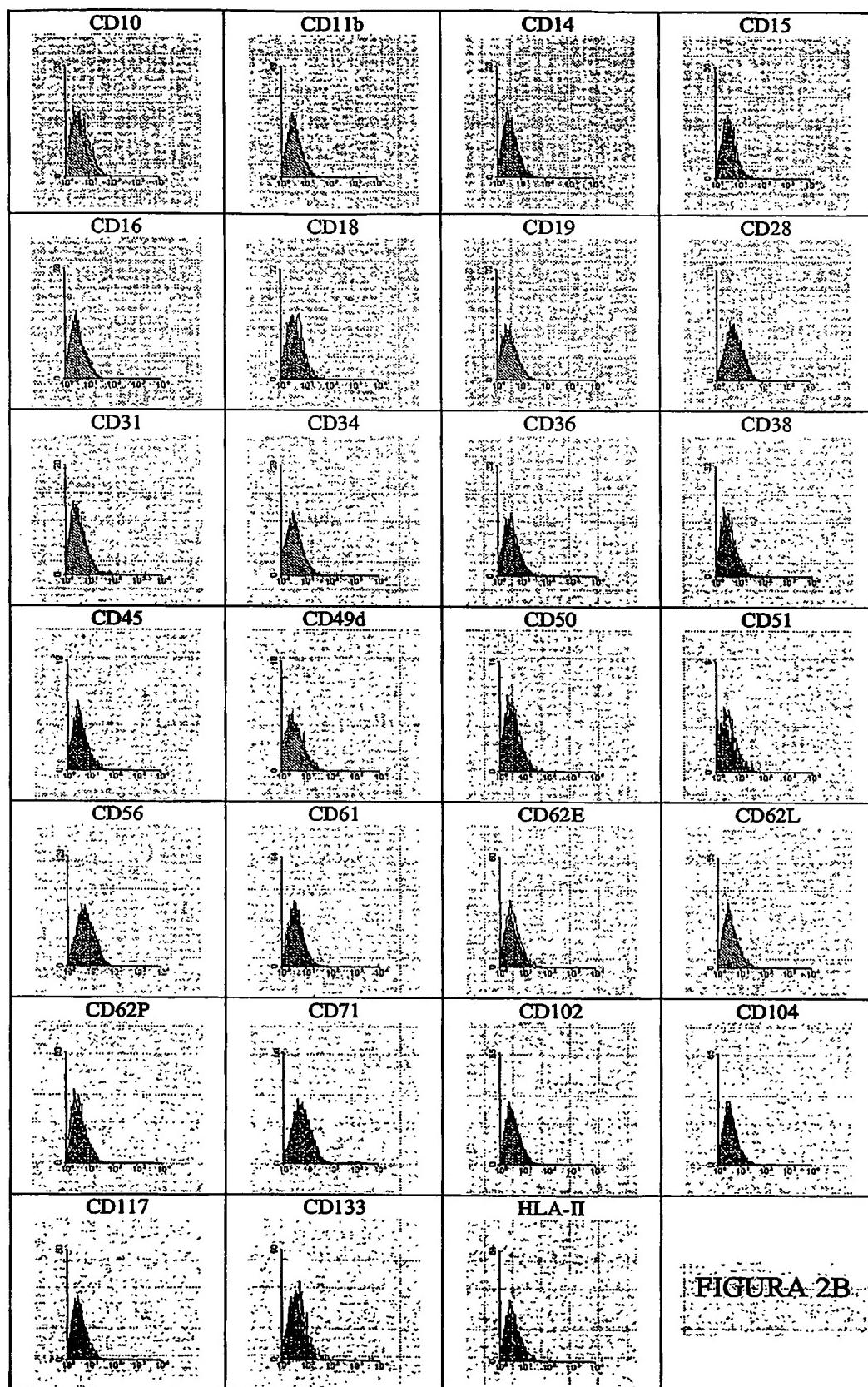


2/9

FIGURA 2A



3/9

**FIGURA 2B**

4/9

FIGURA 3A

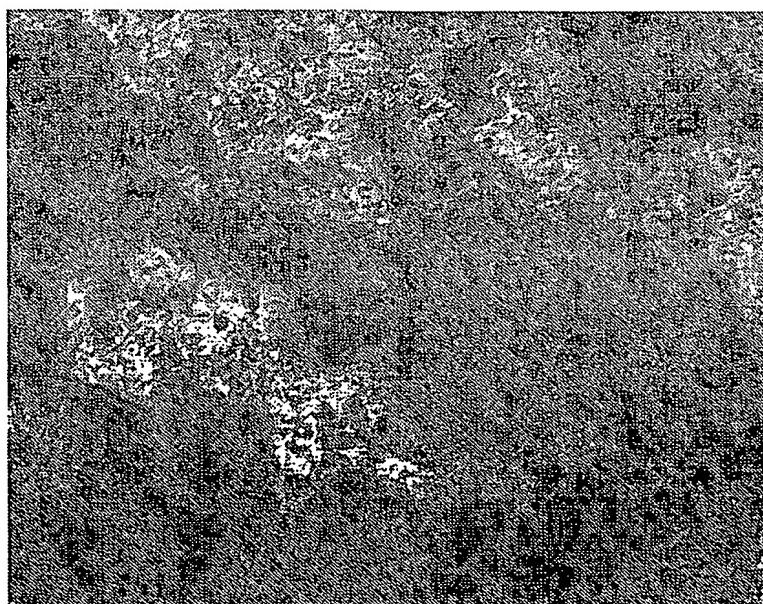
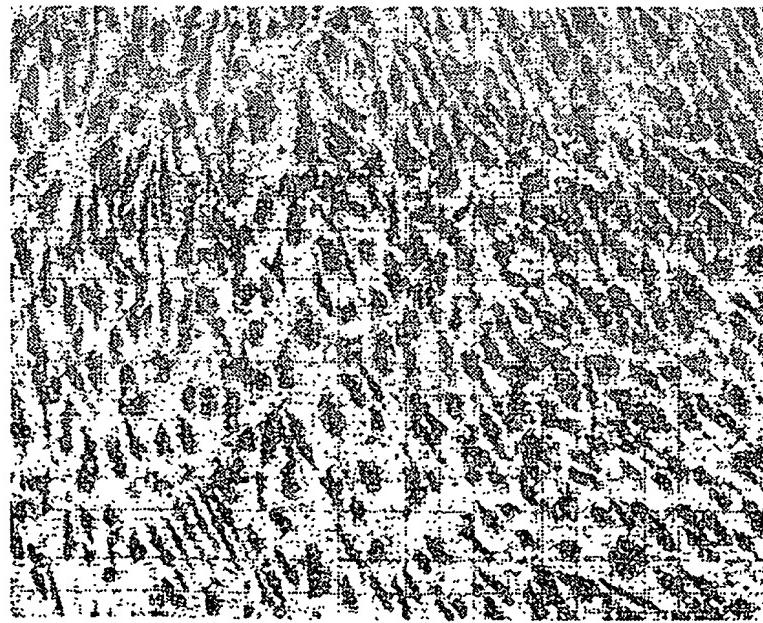


FIGURA 3B



5/9

FIGURA 4A

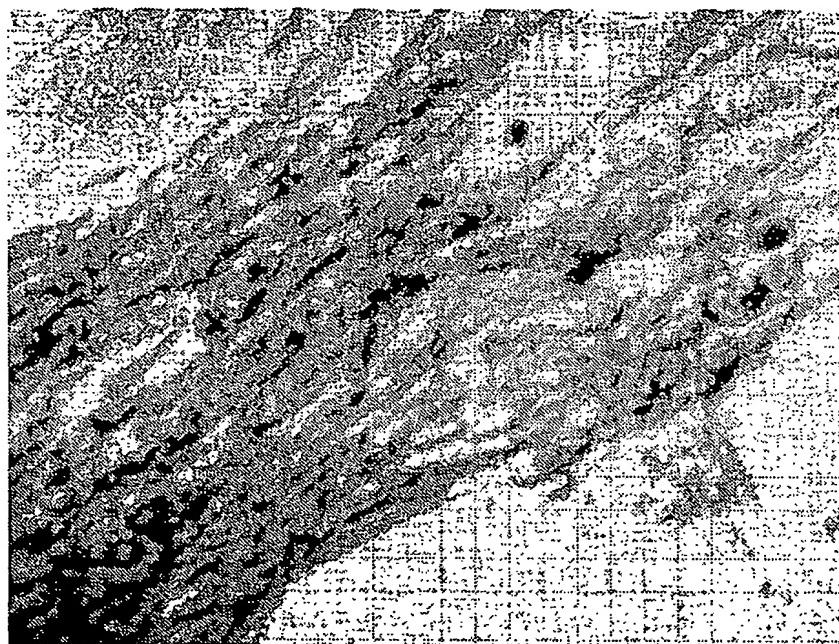
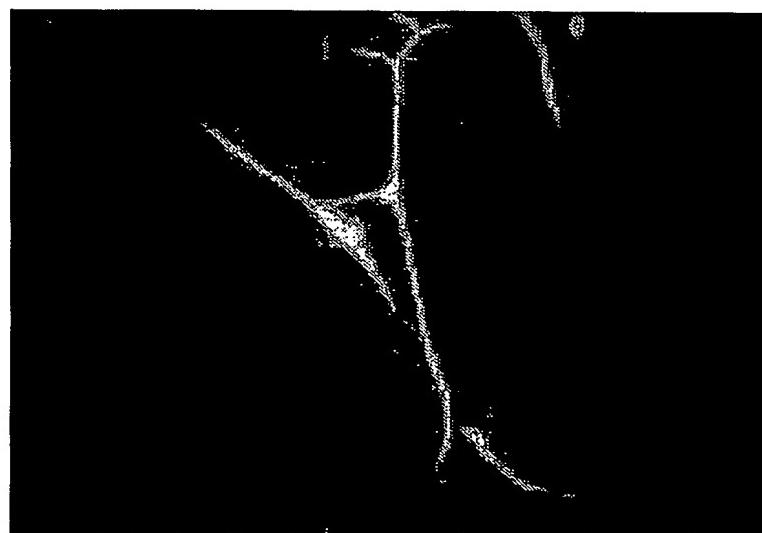
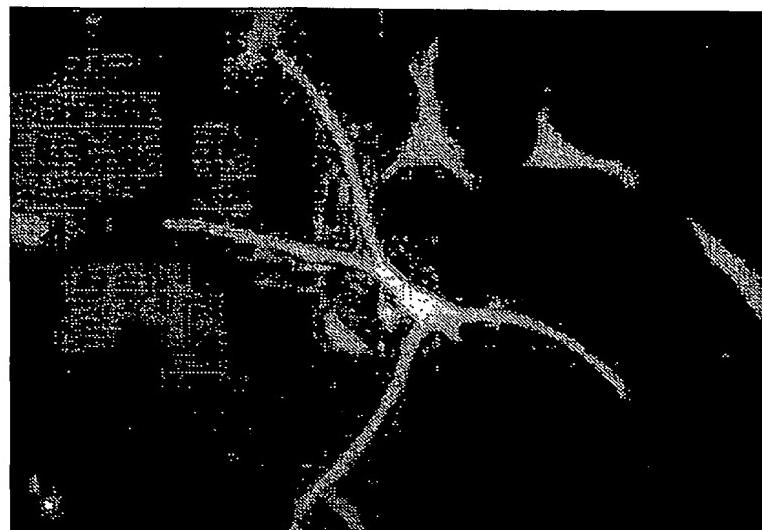


FIGURA 4B



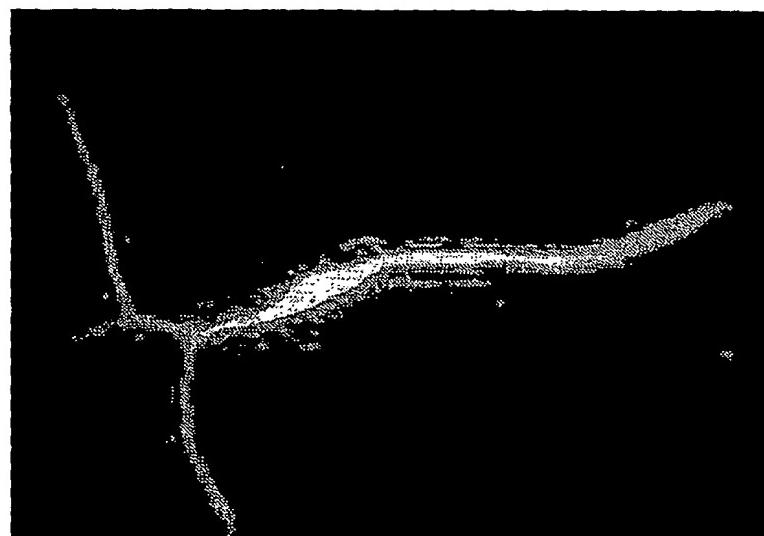
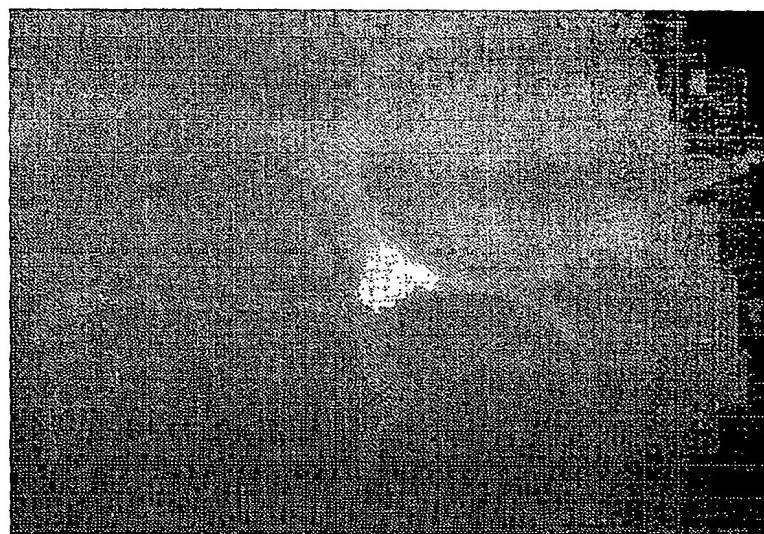
6/9

FIGURA 5A



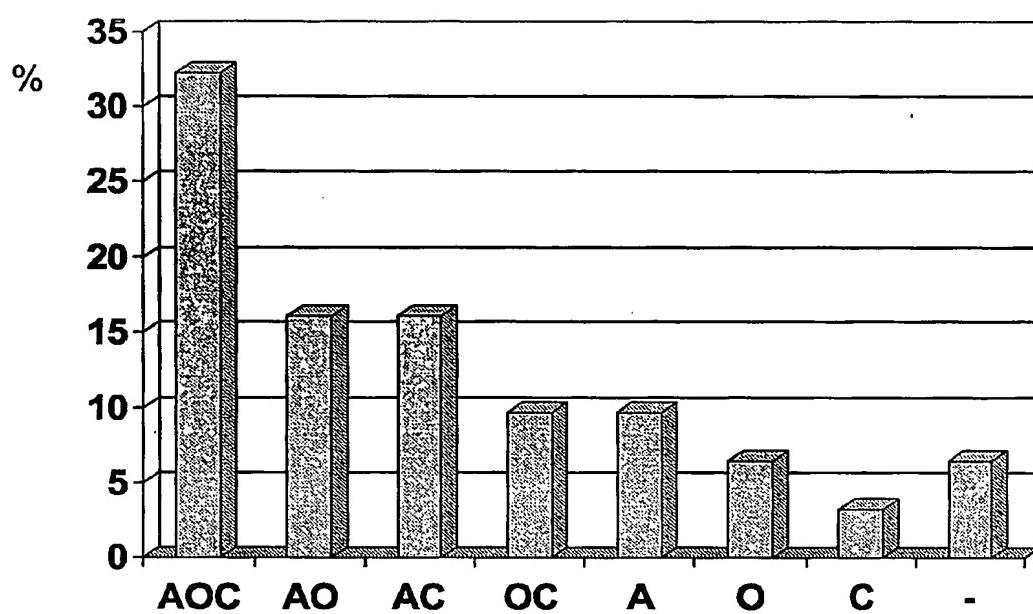
7/9

FIGURA 5B



8/9

FIGURA 6

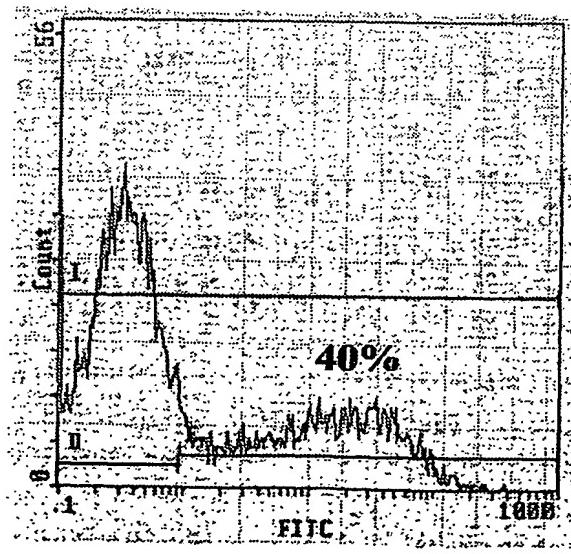


9/9

FIGURA 7A



FIGURA 7B



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.